

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-046094

(43)Date of publication of application : 20.02.2001

(51)Int.Cl.

C12P 7/62
// (C12P 7/62
C12R 1:05)

(21)Application number : 11-226841

(71)Applicant : KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 10.08.1999

(72)Inventor : ODAWARA OSAMU
MIYAMOTO KENJI
YOKOMIZO SATOSHI
MATSUMOTO KEIJI

(54) SEPARATION AND PURIFICATION OF POLY-3-HYDROXYALKANOIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To separate and purify the subject compound which is a biodegradable plastic by adding a surfactant to a suspension of a microbial cell of a microorganism containing a poly-3-hydroxyalkanoic acid and carrying out a physical crushing treatment of the resultant mixture liquid.

SOLUTION: A surfactant is added to a suspension of a microbial cell of a microorganism (e.g. *Aeromonas caviae*) containing a poly-3-hydroxyalkanoic acid comprising a bipolymer of D-3-hydroxybutyrate and D-3-hydroxyhexanoate, a terpolymer, etc., of the D-3-hydroxybutyrate, D-3-hydroxyvalerate and D-3-hydroxyhexanoate and the resultant mixture liquid is then subjected to a physical crushing treatment to thereby separate and purify the objective poly-3-hydroxyalkanoic acid suitable as a raw material, etc. for a plastic product, an implant material without requiring recovery, a drug carrier, a fertilizer carrier, an agricultural mulching film, a fishing gear such as a fishing line, a bag, etc. such as a refuse bag, etc. for composts in high purity and high yield.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 06.08.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-46094

(P2001-46094A)

(43) 公開日 平成13年2月20日 (2001.2.20)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マ-ト* (参考)

C 1 2 P 7/62

C 1 2 P 7/62

4 B 0 6 4

// (C 1 2 P 7/62

C 1 2 R 1:05)

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平11-226841

(22) 出願日 平成11年8月10日 (1999.8.10)

(71) 出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(72) 発明者 小田原 修

兵庫県高砂市西畑1丁目13番1-303

(72) 発明者 宮本 憲二

兵庫県明石市別所町12-32メゾン別所201

(72) 発明者 横溝 聡

兵庫県神戸市垂水区塩屋町6-31-17三青荘

(74) 代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の分離精製方法

(57) 【要約】

【課題】 PHAを含有する微生物菌体から、少ない工程数で高純度のPHAを高収率で得ることのできるPHAの分離精製方法を提供すること。

【解決手段】 ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物菌体の懸濁液に界面活性剤を添加し、得られる混合液を物理的破碎処理することを特徴とするポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の分離精製方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物菌体の懸濁液に界面活性剤を添加し、得られる混合液を物理的破碎処理することを特徴とするポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の分離精製方法。

【請求項2】 ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸が、D-3-ヒドロキシブチレート(3HB)とD-3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)との2成分共重合体またはD-3-ヒドロキシブチレート(3HB)とD-3-ヒドロキシバレレート(3HV)とD-3-ヒドロキシヘキサノエート(3HH)との3成分共重合体である請求項1記載の分離精製方法。

【請求項3】 ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸を含有する微生物が、アエロモナス・キャピエ由来のポリ-3-ヒドロキシアルカン酸合成酵素群遺伝子が導入された菌株である請求項1または2記載の分離精製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の微生物菌体からの分離精製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、プラスチック廃棄物は焼却、埋め立てなどにより処理されているが、これらの処理方法には地球の温暖化や埋め立て地の地盤弛緩等の問題点がある。そのためプラスチックリサイクルへの社会意識の高まりとともに、リサイクルシステム化が進みつつある。しかし、リサイクル可能な用途には限りがあり、実際には、プラスチック廃棄処理方法としては、焼却、埋め立て、リサイクルだけでは対応しきれず、自然界に放置されたままになるものも多いのが現状である。そこで、廃棄後は自然界の物質循環に取り込まれ、分解生成物が有害とならない生分解性プラスチックが注目されており、その実用化が切望されている。

【0003】これらの生分解性プラスチックの中でも、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸(以後PHAと称す)は、多くの微生物種の菌体内にエネルギー蓄積物質として生成、蓄積される熱可塑性ポリエステルであり、自然界の炭素循環プロセスに取り込まれることから生態系への悪影響がほとんどないと予想されているため、特に注目されている。また、医療分野においても、回収不要のインプラント材料、薬物担体としての利用が可能と考えられる。

【0004】前記PHAは、顆粒体を形成して微生物菌体内に蓄積されており、これらをプラスチックとして利用するためには、微生物菌体内から分離精製する必要がある。PHAを微生物菌体から分離精製する既知の方法として、大別するとPHAが可溶である有機溶媒にPHAを溶解させ、PHAを抽出する方法と、PHA以外の菌体構成成分を可溶化させて除くことによりPHAを得

る方法とがある。これらの中で、PHAの分離が容易で、かつ処理工程がより簡素であるという点では、後者の方法が好ましい。

【0005】前記PHA以外の菌体構成成分を可溶化させて除くことによりPHAを得る方法として、例えば、J. Gen. Microbiology, 19, 198-209 頁(1958)には、菌体懸濁液を次亜塩素酸ナトリウムで処理してPHA以外の菌体構成成分を可溶化してPHAを得る方法が記載されている。この方法は、プロセスとしては簡単ではあるが、大量の次亜塩素酸ナトリウムを使用する必要があるためにコストが高くなる。また、PHAの著しい低分子化が引き起こされることや得られたPHA内に無視できない量の塩素が残存することから実用には適さないと考えられる。また、特公平4-61638号公報には、PHAを含有する微生物菌体懸濁液を100℃以上で熱処理することで菌体構造を破壊し、次いでタンパク質分解酵素処理と、リン脂質分解酵素処理あるいは過酸化水素処理とを組み合わせ、PHA以外の菌体構成成分を可溶化し、PHAを得る方法が記載されている。この方法は、熱処理によってタンパク質が変性・不溶化するために、次のタンパク質分解酵素処理工程での負荷が増大すること、更には、処理工程が多く複雑であること等の欠点を有している。

【0006】また、他に微生物菌体を破碎処理する工程を有する方法として、界面活性剤で処理したのち、菌体から放出された核酸を過酸化水素処理して分解し、PHAを分離する方法が提案されている(特表平8-502415号公報)が、毒性の強い過酸化水素を利用するため工業的レベルでの実施は困難である。また、PHA含有微生物菌体を高圧ホモジナイザーで破碎してPHAを分離する方法が提案されている(特開平7-177894号公報)。しかし、この方法は微生物菌体懸濁液を少なくとも3回程度繰り返して高圧処理しなければ純度の高いPHAを得ることはできず、かつ得られるPHAの純度は最高でも70~89%程度と低いという欠点がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、PHAを含有する微生物菌体から、少ない工程数で高純度のPHAを高収率で得ることのできるPHAの分離精製方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸(PHA)を含有する微生物菌体の懸濁液に界面活性剤を添加し、得られる混合液を物理的破碎処理することを特徴とするPHAの分離精製方法に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明に用いられる微生物は、細胞内にPHAを蓄積している微生物であれば特に限定さ

れない。例えば、アルカリゲネス・リポリチカ (*Alcaligenes lipolytica*)、アルカリゲネス・ユトロファス (*A. eutrophus*)、アルカリゲネス・ラタス (*A. latas*) 等のアルカリゲネス属 (*Alcaligenes*)、シュウドモナス属 (*Pseudomonas*)、バチルス属 (*Bacillus*)、アゾトバクター属 (*Azotobacter*)、ノカルディア属 (*Nocardia*)、アエロモナス属 (*Aeromonas*) の菌が挙げられ、中でも、アエロモナス・キャピエ (*Aeromonas caviae*) 等の菌株、またはアエロモナス・キャピエ由来のPHA合成酵素群の遺伝子が導入された菌株、例えば、アルカリゲネス・ユトロファス AC32 (寄託番号 FERM P-15786) (J. Bacteriol., 179, 4821-4830 頁 (1997)) 等がより好ましい。

【0010】これらの微生物の培養方法は、PHAを多量に効率よく菌体内に蓄積できるものであれば特に限定はなく、例えば、前記アルカリゲネス・ユトロファス AC32 (FERM P-15786) を用いる場合には、J. Bacteriol., 179, 4821-4830 頁 (1997) 等に記載の方法が好ましい。

【0011】本発明におけるポリ-3-ヒドロキシアルカン酸 (PHA) とは、D-3-ヒドロキシブチレート (3HB) のホモポリマーや3HBと他の3-ヒドロキシアルカン酸との共重合体などを示すが、中でも3HBとD-3-ヒドロキシヘキサノエート (3HH) との2成分共重合体 (Macromolecules, 28, 4822-4828 (1995)) または3HBとD-3-ヒドロキシバレレート (3HV) と3HHとの3成分共重合体 (特開平8-289797号公報) が、物性の面からより好ましい。ここで3HBと3HHの2成分共重合体を構成する各モノマーユニットの組成比については、特に限定されるものではないが、3HBの含有量が1~99モル%、3HHユニットの含有量が1~99モル%のものが好適である。また、3HBと3HVと3HHとの3成分共重合体を構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、例えば、3HBユニットの含有量が1~95モル%、3HVユニットの含有量が1~96モル%、3HHユニットの含有量が1~30モル%のものが好適である。また、これらのPHAの分子量は、10万以上が好ましく、50万以上がより好ましい。

【0012】PHAの微生物菌体中の含有率は、高い方が好ましいのは当然であり、工業レベルでの適用においては乾燥菌体中に20重量%以上が好ましく、界面活性剤処理、物理的破碎処理、分離操作、分離したPHAの純度等を考慮すると50重量%以上が特に好ましい。

【0013】本発明においては、前記のように培養して得られた微生物菌体の懸濁液に界面活性剤を添加する。なお、本発明における「微生物菌体の懸濁液」とは、培養終了後の培養懸濁液または培養液から遠心分離等で分

離した菌体を水に懸濁させた水性の懸濁液を意味する。該懸濁液中における菌体濃度は、湿菌体換算で500g/l以下が好ましく、300g/l以下がさらに好ましい。

【0014】本発明で使用する界面活性剤としては、陰イオン性、陽イオン性、両性もしくは非イオン性でも良く、具体的には、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシルスルホン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウム、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルビリジニウムクロリド、3-((3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルホン酸、3-((コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ)-2-ヒドキシ-1-プロパンスルホン酸、ドデシル-N-ベタイン、オクチルグルコシド、ヘプチルチオグルコシド、ポリエチルエチレンドデシルエーテル、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビトールエステル等が挙げられるが、これらに制限されるものではない。本発明においては、特にドデシル硫酸ナトリウム、ドデシルスルホン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウム等が、価格、使用量や添加効果の点から好ましい。

【0015】界面活性剤の添加量は、特に制限されないが、微生物菌体重量 (湿菌体換算) 100重量部に対して、0.001~50重量部が好ましく、1~20重量部がより好ましい。該添加量は、界面活性剤の添加効果が良好な観点から、0.001重量部以上が好ましく、低コストである観点から、50重量部以下が好ましい。また、得られた混合液は、PHA以外の菌体構成成分の可溶化を促進させる観点から、室温下で1分~2時間程度攪拌することが好ましい。

【0016】次いで、前記混合液を物理的破碎処理する。本発明においては、かかる物理的破碎処理を行なうことにより、前記微生物菌体を破碎してPHAを菌体外に漏出させる効果を有する。

【0017】本発明における物理的破碎処理とは、超音波による破碎、高圧ホモジナイザーやミル等による破碎等が挙げられる。高圧ホモジナイザーとしては、独国のAPV・ゴーリン社製「マントンゴーリン (商品名)」、デンマークのAPVラニー社製「ミニラボ (商品名)」、米国のマイクロフルイディクス (Microfluidics) 社製「マイクロフルイタイザー (商品名)」等が挙げられ、ミルとしては、スイスのウィリー・エー・バックオフエン (Willy A. Bachofen) 社製「ダイノミル (商品名)」等が挙げられるが、同等の破碎効果が得られればこれらに限定されるものではない。

【0018】物理的破碎処理の条件としては、用いる手段により一概には限定できないが、例えば、超音波による破碎の場合、米国のブランソン (Branson) 社製、ソニ

ファイヤーを用いて、出力5、簡欠サイクル50%で30分間の超音波処理であることが好ましい。高圧ホモジナイザーによる破碎の場合、デンマークのAPVラニー社製のミニラボを用いて、500kgf/cm²で1時間の高圧破碎処理であることが好ましい。ミル等による破碎の場合、スイスのフィリー・エー・バックオフエン社製のダイノミルを用いて1l/hの流量で1時間の破碎処理であることが好ましい。

【0019】また、前記物理的破碎処理は、破碎処理液を少量遠心管にとり、例えば、3000rpmで10分間遠心処理を行なった後、沈澱物が得られるかどうかを確認することで完了する。

【0020】次に、物理的破碎処理して得られた処理液を、遠心分離してPHAを沈殿させる。本発明においては、かかる遠心分離を行なうことにより、PHA以外の菌体構成成分とPHAとを容易に分離することができる。該遠心分離の条件は、特に限定はなく、室温下で、1000～15000rpm、5～60分間程度行なえばよい。遠心分離は、必要に応じて、複数回行なってもよい。また、得られたPHAの沈澱物を常法により乾燥することが好ましい。

【0021】得られたPHAの純度は、実用化、加工性及び物性の観点から、90%以上が好ましい。なお、該純度の測定方法としては、例えば、後述の実施例に記載の方法が挙げられる。

【0022】また、得られたPHAは、そのままでも高純度であるが、目的に応じて、公知の精製方法、例えば、リゾチーム等の溶菌酵素（特公平4-61638号公報）、トリプシンやプロナーゼ等の蛋白質分解酵素（特開平5-336982号公報）、過酸化水素等の過酸化剤（特表平8-502415号公報）等を作用させて、更に純度を向上させることができる。

【0023】以上のような構成を有する本発明のPHAの精製分離方法は、従来の方法に比べ、工程数が少なく、効率よくPHAを得ることができるものである。

【0024】本発明により得られたPHAは、実用品として十分に高い純度を有するものであり、例えば、プラスチック製品、回収不要のインプラント材料、薬物担体、肥料担体、農業用マルチフィルム、釣糸等の漁具、コンポスト用ゴミ袋等の原料として好適に用いられる。

【0025】

【実施例】本実施例で用いた微生物は、アエロモナス・キャピエ由来のPHA合成酵素群遺伝子を導入したアルカリゲネス・ユウトロファス AC32（寄託番号FERM P-15786）である。これを、J. Bacteriol., 179, 4821-4830 頁（1997）に記載の方法で培養し〔培地：Na₂HPO₄・12H₂O 11.3g、KH₂PO₄ 1.9g、(NH₄)₂SO₄ 6g、プロエキス（播州調味料（株）製）10g、MgSO₄・7H₂O 1g、ヤシ油50g、微量金属元素溶液（組成：FeCl₃・6H₂O 16.2g、CaCl₂・2H₂O 10.3g、CoCl₂・6H₂O 0.2g、NiCl₂・6H₂O 0.1g、CrCl₃・6H₂O 0.1g、CuSO₄・5H₂O 0.2g/l、0.1N HCl）5ml/l、pH 6.7、培養温度30℃、培養時間72時間〕、ポリ（D-3-ヒドロキシブチレート-co-D-3-ヒドロキシヘキサノエート）（以下、ポリ（3HB-co-3HH）、3HBユニット：3HHユニット=90：10（モル比）、分子量約100万）を約50重量%（乾燥重量）含有した菌体を得た。次にこれを遠心分離処理（5000rpm、10min）によって培養液から分離し、得られたペースト状菌体に水を加えて100g/l（湿菌体換算）の水性懸濁液とした。この水性懸濁液を用いて、以下に示す実施例を行なったが、本発明はこれらの実施例等によりなら限定されるものではない。

【0026】なお、菌体から分離して得られたポリ（3HB-co-3HH）の純度は、以下のようにして決定した。すなわち、菌体より分離して得られた沈澱物の乾燥物10mgを、クロロホルム1mlに溶解したのち、メタノール0.85mlと濃硫酸0.25mlを加えて100℃で140分間処理した。これを冷却後、硫酸アンモニア飽和水溶液0.5mlを加えて激しく攪拌して静置し、下層部をキャピラリーガスクロマトグラフィーにて分析して、分離物中のポリ（3HB-co-3HH）の純度を求めた。

【0027】実施例1
上記のポリ（3HB-co-3HH）含有微生物菌体の懸濁液1000mlに、10g/lとなるようにドデシル硫酸ナトリウムを加えて、室温で1時間攪拌した。次にこれを「ダイノミル」（スイス、ウィリー・エー・バックオフエン社製）を用いて1l/hの流速で1時間、破断処理した。得られた処理液を遠心分離（8000rpm、10min）して沈澱物を集めた。該沈澱物を乾燥後、ポリ（3HB-co-3HH）の純度を決定したところ94%であった。

【0028】実施例2
上記のポリ（3HB-co-3HH）含有微生物菌体の懸濁液1000mlに、10g/lとなるようにドデシル硫酸ナトリウムを加えて、室温で1時間攪拌した。次にこれを「ミニラボ」（デンマーク、APVラニー社製）を用いて500kgf/cm²で1時間、破断処理した。得られた処理液を遠心分離（8000rpm、10min）して沈澱物を集めた。該沈澱物を乾燥後、ポリ（3HB-co-3HH）の純度を決定したところ95%であった。

【0029】実施例3
実施例1においてドデシル硫酸ナトリウムをドデシルスルホン酸ナトリウムに変更した以外は同様の操作を行なった。該沈澱物を乾燥後、ポリ（3HB-co-3HH）の純度を決定したところ94%であった。

【0030】比較例1

実施例1において「ダイノミル」による破断操作を行

7

なわなかった以外は同様の操作を行なった。その結果、遠心分離しても沈殿物は得ることはできず、ポリマーは全く分離できなかった。

【0031】比較例2

実施例1においてドデシル硫酸ナトリウム処理を行なわなかった以外は同様の操作を行なった。その結果、遠心分離して得られた沈殿物の純度は、懸濁前のポリ(3HB-co-3HH)含有微生物菌体の純度と同じ50%であった。

【0032】比較例3

ポリ(3HB-co-3HH)含有微生物菌体の懸濁液100mlを「ダイノーミル」を用いて11/hの流速で1時間破断処理した後、10g/lになるようにドデシル硫酸ナトリウムを加えて室温で1時間攪拌した。得られた菌体懸濁液は非常に粘重で、遠心分離処理してもポリ(3HB-co-3HH)を得ることはできなかった。

【0033】以上の結果より、実施例1～3で得られた*

(5)

特開2001-46094

8

*ポリ(3HB-co-3HH)は、いずれも界面活性剤を使用していない比較例2で得られたものに比べ、高純度のものであることがわかる。

【0034】また、実施例1～3及び比較例1～3の結果より、ポリ(3HB-co-3HH)の分離精製方法には、物理的破砕処理と界面活性剤の添加の両方が必要であるが、界面活性剤の添加処理液を物理的破砕処理することにより顕著な効果が得られる。

【0035】

- 10 【発明の効果】本発明によれば、高純度のポリ-3-ヒドロキシアルカン酸(PHA)を効率よく、極めて簡単に得られるため、本発明は、PHAの工業的生産の効率向上およびコストの低減に大きく寄与するものである。また、本発明により得られるPHAは、実用品として十分に高い純度を有するものであり、例えば、プラスチック製品、回収不要のインプラント材料、薬物担体、肥料担体、農業用マルチフィルム、釣糸等の漁具、コンポスト用ゴミ袋等の原料として好適に用いられる。

フロントページの続き

(72)発明者 松本 圭司
兵庫県西宮市大森町11-33

Fターム(参考) 4B064 AD83 BA18 CA02 CA19 CC24
CE02 CE03 DA01 DA16